第 30 卷 第 1 期
1987 年 2 月
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
Vol. 30, No. 1
Feb., 1987

柞蚕蛹血淋巴中凝集素的分离鉴定

李士云 吴克佐 张双全* 邱雪贞 屈贤铭
(中国科学院上海生物化学研究所)

摘要 在柞蚕蛹血淋巴中可以测得血凝活力，但在大肠杆菌诱导后血淋巴中血凝滴度有很大的升高。本文报道了分离正常柞蚕蛹血淋巴中凝集素的提取步骤。所得的凝集素在 SDS 垂直板电泳中表现单一条带，免疫扩散呈现单一的沉淀带，分子量为 40,000 道尔顿。制剂能凝集兔、鸭、豚鼠、羊、马及人的 A、B、O和 AB 型的红细胞。其凝集活力可被半乳糖，乳糖，及 N-乙酰半乳糖胺所抑制。

诱导后的柞蚕蛹血淋巴的凝集素成分比较复杂，经亲和层析后的制剂在免疫琼脂双扩散盘中呈现二条沉淀带，在垂直电泳中至少有二条带。

关键词 柞蚕蛹 凝集素 大肠杆菌

已经知道在昆虫和其他一些无脊椎动物中含有凝集素，特别是经体表损伤或细菌诱导后凝集素活力有明显升高(屈贤铭等，1985；Komano 等，1980；1981；Suzuki 等，1983)，不同来源的血淋巴凝集素糖结合专一性不同 (Parrinello 等，1982；Ryoyama 等，1974；Hall 等，1974；Anderson 等，1975；Renwrantz 等，1983；Lackie 等，1983)。普遍认为无脊椎动物的凝集素和免疫监视有关 (Komano 等，1981；Suzuki 等，1983)。有些无脊椎动物的凝集素还具有调理素作用，能调节细胞的粘着 (Renwrantz 等，1983)，并认为是无脊椎动物识别非我的分子基础 (Wago，1982；1983)。在全变态昆虫蛹化前期需要降解原属自我的幼虫组织碎片，而这个过程中又是完成全变态过程必不可少的。在棕尾别麻蝇中的凝集素就被认为调节这种发育极其重要的因子 (Komano 等，1981；Suzuki 等，1983)，在家蚕中大部分的发育阶段用一般的血凝反应测不到有凝集活力，只有在蛹化前期能测得较高的凝集素活力。因之也顺理成章地推论凝集素是完成变态过程中的一个重要因子。由于昆虫中的凝集素有如此重要的生理作用，许多工作者曾用棕尾别麻蝇 (Komano，1980)，家蚕 (Suzuki，1983)，蓖麻蚕(莫汉庆等，1983)及美国蜚蠊 (Anderson 等，1972)为材料提纯凝集素，但除棕尾别麻蝇外，其余均未得到纯品。

屈贤铭等 (1985) 已报道柞蚕 *Antheraea pernyi* 蛹的血淋巴中有凝集素的存在，但经细菌诱导后，凝集素的活力有明显提高，本文报道了柞蚕蛹血淋巴凝集素的提纯，这也是首次报道了从鳞翅目昆虫得到电泳组分单一的凝集素。

材 料 与 方 法

1. 昆虫和血淋巴的采集 柞蚕蛹全部为滞育蛹，主要由辽宁凤城辽宁蚕业研究所提

本文于 1985 年 2 月收到。
* 北京医学院细胞学研究室工作。
本工作得到王克夷同志的关心与支持，谨此致谢。

供,品种为青黄一号。正常血淋巴的采集系剪开蛹尾部,取血淋巴,流入放有一些苯基硫脲颗粒的烧杯中,诱导源为大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$, 菌株来自斯德哥尔摩大学微生物学系,诱导方法如前文(Qu 等,1982),每只柞蚕蛹给以 50 微升生理盐水中含有约 10^6 个活的大肠杆菌,诱导后 3—7 天放血。采血方法同正常,取得的血淋巴经 10,000rpm 离心,上清液再用玻璃纤维滤去少量脂肪,一般均随取随用。偶尔贮于一20℃ 低温冰箱 1—2 天。

2. 凝集素活力测定 通常分析测定用兔红血球(屈贤铭等,1985),凝集其它血球试验,除所用血球不同外,处理方法相同。

3. 蛋白水解酶处理红血球 压紧的红血球 0.2 毫升悬浮于 0.7 毫升的生理盐水中,再加入 0.1 毫升的 1 毫克/毫升的牛胰蛋白酶(本所东风厂)或蛋白酶 Type IV (Sigma) 的 0.2mol/L, pH 8.3 Tris-HCl 缓冲液中, 37℃ 保温 30 分钟,然后用生理盐水反复洗涤多次后使用。

4. 血凝抑制试验 25 微升的凝集素样品,与待测的糖类 25 微升,先振摇 10 分钟,再加入 25 微升的红血球悬浮液,振摇 15 分钟后放置 37℃ 保温,血球凝集测定与凝集活力测定条件相同。

5. 蛋白浓度测定 粗样品以双缩脲方法测定,纯样品以 Mcknight 法 (Mcknight 等,1979)测定,均以牛血清白蛋白作标准样品。

6. 酸处理交联琼脂糖 6B 的制备 酸处理 Sepharose tL-6 B (Pharmacia) 制备见王克夷等(1983)一文,水解后 Sepharose 柱(18×3 厘米)用 pH 6.4 0.01 mol/L 醋酸-醋酸铵缓冲液内含 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$ 0.13 mol/L NaCl 平衡,简称 AT-6B 柱。

7. 垂直聚丙烯酰胺板电泳(PAGE) 制备板电泳基本上按照 Maurer 等(1971)介绍的系统,大孔胶浓度为 3%,分离胶浓度为 5%,板为 160×140×1.0 毫米。制胶缓冲液为 pH 8.9 Tris-HCl,电极缓冲液为 pH 8.3 Tris-甘氨酸,进胶前电流为 10 毫安,进胶后为 20 毫安,电泳约 6 小时,待指示剂出胶后即停止电泳。蛋白染色用 0.2% 考马斯亮蓝R_{250},糖染色用 Schiff 试剂 (Dabois 等,1956)及硫酸酚法 (Segrest 等,1972)。

8. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 蛋白样品处理及电泳条件同 Qu 等(1982),测分子量用的标准蛋白为牛血清白蛋白(分子量 68,000),卵白蛋白(分子量 45,000),猪胃蛋白酶(分子量 35,000),及胰凝乳蛋白酶原(分子量 25,000),以上均为 Sigma 产品。

9. 抗血清的制备及琼脂双扩散测定 新西兰兔每只重 2.5 公斤左右,每只给 1 毫克的亲和层析后正常血淋巴凝集素样品,加等体积的福氏全佐剂,磨匀后于背部皮内多点注射,半个月后又给每只兔子 0.5 毫克的相同样品,福氏全佐剂同样于背部皮内多点注射。前二次在腹股沟淋巴结附近各注射 0.5 毫升百日咳疫苗。三个月后,每只兔子给 150 微克同样样品加不完全佐剂于腿部肌肉注射,一周后以琼脂双扩散测得有较强沉淀条纹后放血。收集抗血清,加固体硫酸铵到 50% 饱和度,离心,收集沉淀,沉淀充分透析除尽铵离子,然后再用 0.0175mol/L pH 6.4 磷酸盐缓冲液平衡,通过用此缓冲液平衡的 DE-52 纤维素柱,免疫球蛋白 G 不被吸附流出,收集免疫球蛋白 G,超滤浓缩,对生理盐水透析存于 - 20℃低温冰箱中备用。琼脂双扩散根据 Shiver 等(1967)报道的方法。

实 验 结 果

1. 亲和层析分离　作者(1985)已报道了柞蚕蛹正常血淋巴中有凝集素活力存在。收集正常血淋巴 750 毫升在 70℃ 水浴中加热 15 分钟后，离心去除沉淀，得上清液 650 毫升，加入 400 毫升 pH 6.4 0.01 mol/L 醋酸-醋酸铵缓冲液(含 0.13mol/L NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$)，上 AT-6B 柱。然后用含 0.2mol/L 半乳糖的上述平衡缓冲液洗脱，结果如图 1:A。收集峰区样品，经超滤浓缩后对缓冲液透析以除去半乳糖，尔后测定对兔红血球的凝集活力。每 100 毫升血淋巴约得 1 毫克左右样品。

2. 大肠杆菌诱导后柞蚕蛹血淋巴凝集素的亲和层析分离　收集注射大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$ 于柞蚕蛹 3—7 天后的血淋巴液，如同正常血淋巴加热处理或在制备抗菌肽时经Sephadex--G-100 分离 (Qu 等，1982)，收集合并具有凝集素活力部分，再经 AT-6B 柱亲和层析分离洗脱条件也同正常血淋巴，结果见图 1:B。

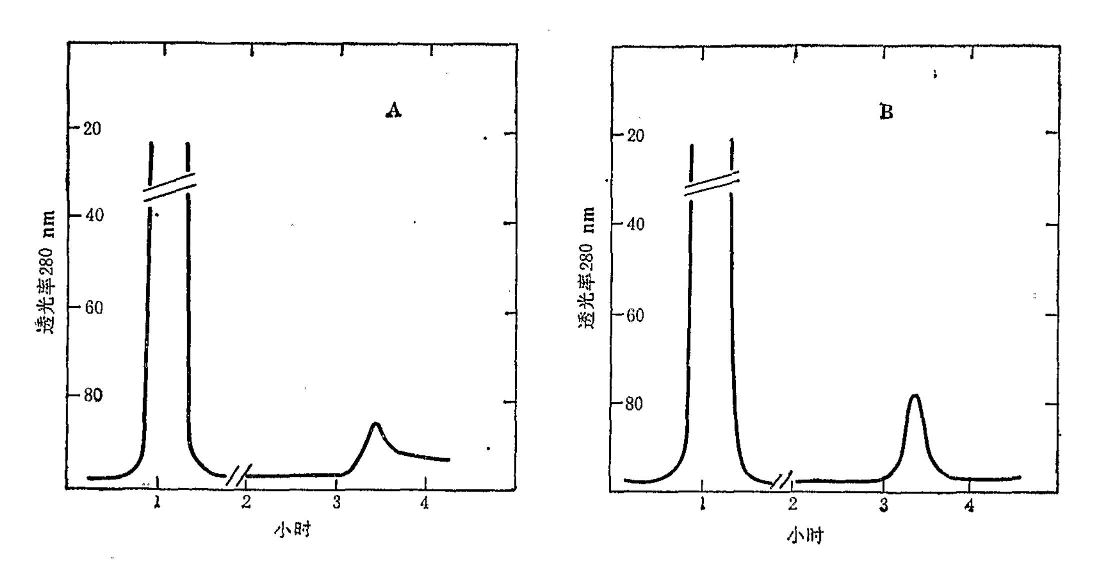


图 1　柞蚕蛹凝集素在 AT-6B 亲和柱上的层析行为(柱：4.5×21cm 流速：5ml/分)
A. 正常血淋巴液　B. 细菌诱导后血淋巴液

3. 亲和层析后的制剂用聚丙烯酰胺电泳再纯化　经亲和层析后正常的凝集素在 pH 8.3 Tris-甘氨酸缓冲液中电泳结果见图 2：A。从图：2A 中可见正常的血淋巴凝集素至少有二个组分。经细菌诱导后较复杂至少有 3 个组分，而且杂蛋白含量更多，比较难提纯。

正常血淋巴的凝集素样品，在电泳分离后若以 Shiff 试剂染色，有两条色带，为糖蛋白，但着色深浅不同。为此我们再用垂直制备型 PAG 电泳进行纯化。在指示剂出胶后再电泳 1 小时。电泳毕取出凝胶并每隔 3 毫米横向切割，胶条用 0.01mol/L pH 6.4 醋酸-醋酸铵缓冲液抽提，分别测定凝集素活力。合并并浓缩活力部分，将制备电泳所得样品进行 SDS 电泳测定分子量其结果如图 2：B。从图 2：B 可见该样品为单一条带，其最小分子量约 40,000 道尔顿。这和已报道的棕尾别麻蝇凝集素在经巯基乙醇处理下，SDS 电泳结果由 4 个 32,000 的 α-亚基和二个 30,000 β-亚基组成的分子量为 190,000比较有

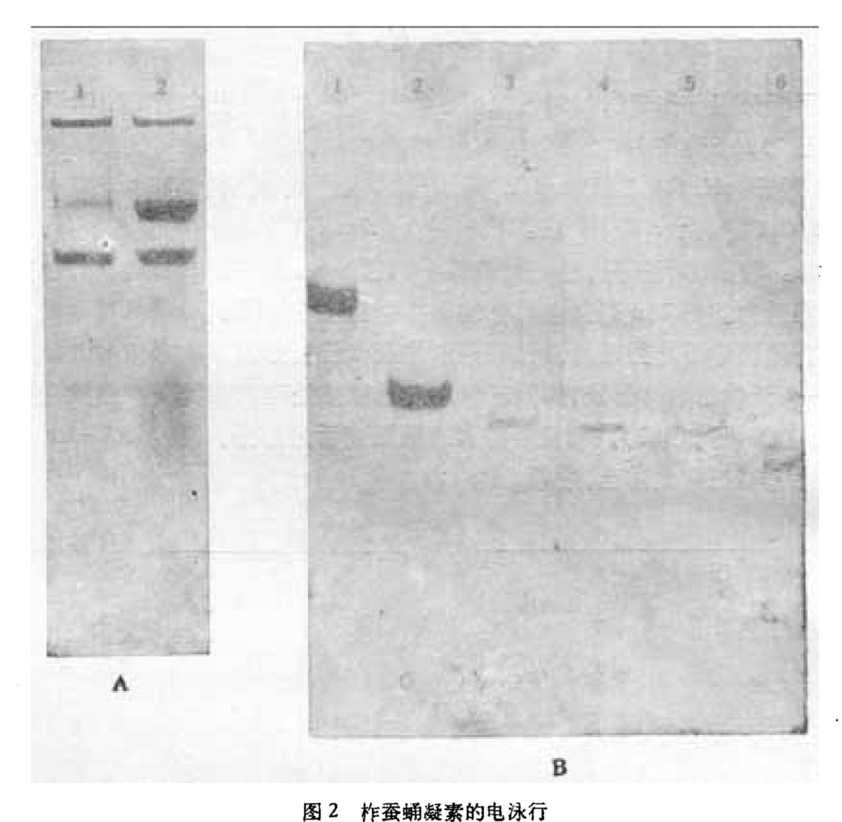


图 2　柞蚕蛹凝素的电泳行

A. 在 PAGE 垂直平板电泳中，凝胶浓度：5%

1. 正常　2. 细菌诱导

B. 在 SDS-PAGE 垂直平板电泳中，凝胶浓度：7%

1. 牛血清白蛋白（分子量 68,000）　2. 卵白蛋白（分子量 45,000）　3. 电泳纯化后凝集素（正常）　4. 电泳纯化后凝集素用巯基乙醇处理过（正常）　5. 胃蛋白酶（分子量 34,000）　6. 胰凝乳蛋白酶原（分子量 25,000）

较大的区别。

我们将正常血淋巴亲和层析后样品免疫兔子所得的抗血清和制备电泳所得的样品进行琼脂双扩散检测，结果见图 3。图 3 的中心孔是免抗正常凝集素一IgG，四周分别为电泳纯的正常血淋巴凝集素，正常血淋巴的亲和层析样品，大肠杆菌诱导三天后的柞蚕蛹血淋巴。从图 3 可见正常血淋巴凝集素经亲和层析或电泳纯均为单一沉淀线而且两者是完全交叉的。其免疫原性是相同的。从图 3 也可见大肠杆菌诱导后的亲和层析样品除一条和正常血淋巴凝集素完全交叉外，还再有一条沉淀线，这可能是细菌诱导后新合成的一类凝集素。未经纯化的血淋巴其沉淀线则比较复杂。这也不同于棕尾别麻蝇，无论诱导与否都只一条免疫沉淀线。

我们还比较了经亲和层析或经制备电泳纯化后的凝集素对几种动物红血球的凝集作用。观察到对兔，鸭，豚鼠，羊，马及人的 A，B，O 和 AB 型红血球都能凝集。Parrinello 等（1982）报道海鞘类动物 *Ascidia malaca* 血清凝集素及名取俊二报道棕尾别麻蝇血淋巴凝集素对蛋白酶并不敏感（Komano 等，1980）。而家蚕凝集素对蛋白酶较敏感（Suzuki 等，

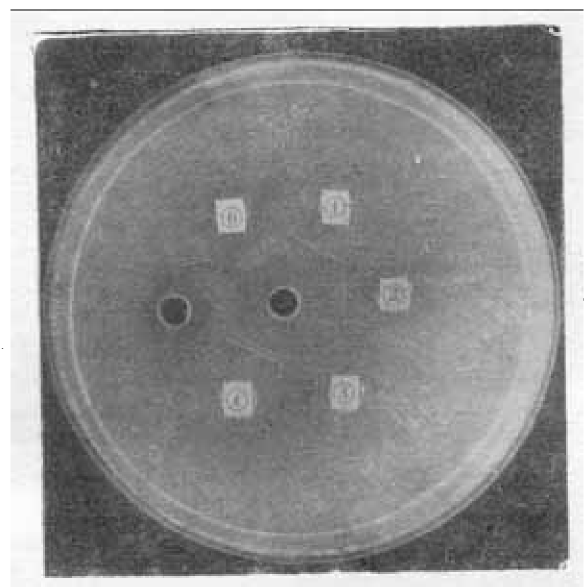


图 3　柞蚕蛹凝集素对抗体的免疫扩散图谱中心孔：兔抗正常凝集素-IgG
1.2.正常凝集素(电泳纯)　3.正常亲和层析后凝集素　4. *E. Coli*诱导亲和层析后凝集素　5.正常血淋巴液　6. *E. coli* 诱导后血淋巴液

1983)。我们以(30 微克/毫升)胰蛋白酶或蛋白酶 4 型与凝集素混合，在 37℃ 保温 15 分钟及 30 分钟后都没有观察到凝集素活力的丧失，反而观察到凝集素活力强度有明显提高。这可能是残留的蛋白酶对测试的正常兔红血球作用，使凝集素对蛋白酶处理的红血球凝集能力增强了。

经亲和层析提纯后的样品，在冰箱中保存 4 星期后，活力明显降低，并有许多沉淀产生，因而我们还观察了凝集素的热稳定性，发现凝集素浓度为 0.5 毫克/毫升，100℃ 加热 15 分钟活力完全丧失，但 70℃ 加热 15 分钟活力变化不显著。

凝集素的功能和它对糖作用的专一性关系十分密切。我们测试了几种糖在 0.2mol/L 浓度时 0.5 毫克/毫升凝集素的抑制作用，结果列于表 1，从表中可见 D-半乳糖的抑制作用较强，次之为乳糖，N-乙酰-半乳糖胺也有抑制作用。葡萄糖，N-乙酰-葡萄糖胺，D-果糖，D-甘露糖，L-岩藻糖，则不能抑制。

表 1　几种糖对柞蚕蛹凝集素凝集兔红血球的影响

糖类名称	血球凝集反应
葡萄糖	+
L-岩藻糖	+
D-半乳糖	−
D-果糖	+
乳糖	−
D-甘露糖	+
N-乙酰-葡萄糖胺	+
N-乙酰-半乳糖胺	−

讨 论

有关昆虫凝集素已有一些报道 (Komano 等, 1980; 1981; Suzuki 等, 1983), 但其生物学意义并不清楚。最近一些工作表明, 它和识别外源物质有关, 在机体受到创伤 (Komano 等, 1980; 1981; 名取俊二, 1982) 或细菌诱导后凝集素活力明显提高(屈贤铭等, 1985), 因而被认为在无脊椎动物的免疫防卫系统中是具有重要作用的组分之一 (Komano 等, 1980;1981)。名取俊二等还报道了某些昆虫中的凝集素具有活化老鼠骨髓细胞对某些细菌的吞噬作用及溶解肿瘤细胞作用 (Komano 等, 1980;1981; Suzuki 等, 1983), 因而对昆虫凝集素的研究既有理论意义也可能有实用意义。

屈贤铭等 (1985) 已报道正常柞蚕蛹血淋巴凝集素滴度为 128, 经大肠杆菌诱导后滴度提高到 2048, 而本文图 1: B 的峰要比图 1: A 的峰高, 后者的上柱样品的体积反比前者少, 这也佐证了经诱导后凝集素的量有较大增高。但从图 2: A 的结果显示其组分也较复杂, 增加了提纯的困难。对经诱导后柞蚕蛹血淋巴凝集素的提纯方法还待进一步摸索。

莫汉庆等(1983)报道了蓖麻蚕血淋巴存在着凝集素, 名取俊二等报道了在家蚕蛹化前期的血淋巴中也存在凝集素, 但提纯都比较困难。后者报道了纯化 10—15 倍, 在 SDS 电泳中至少有 10 条以上的条带。热不稳定, 在 70℃ 保温 5 分钟即丧失全部活力, 其分子量在 200,000 以上, 糖抑制试验也表明, 只是较低浓度的葡萄糖醛酸及半乳糖醛酸有抑制外, 其它所测试的碳水化合物的抑制作用都不明显。而棕尾别麻蝇经损伤体表所得到的凝集素由 4 个 α-亚基 2 个 β-亚基所组成, 分子量高达 190,000 道尔顿, 比柞蚕蛹凝集素的分子组成复杂得多。从已测试的一些性质, 家蚕和柞蚕蛹两种凝集素差别是明显的。蓖麻蚕血淋巴的凝集素(莫汉庆等, 1983)能凝集兔及大鼠的红血球, 不凝集猪, 豚鼠, 鸡及任何血型的人红血球, 也不同于柞蚕蛹的血淋巴凝集素能凝集 A, B, O 及 AB 型的人红细胞。这也提示了不同昆虫的凝集素其受体是不同的。关于柞蚕蛹凝集素的作用受体及其它生物功能进一步研究正在进行中。

参 考 文 献

屈贤铭等 1985 大肠杆菌及聚肌胞核苷酸对家蚕、柞蚕蛹血淋巴诱导产生溶菌酶、抗菌肽及凝集素的动力学观察。昆虫学报 **28**(1): 1 -7。

莫汉庆、孙册 1983 蓖麻蚕血淋巴中的凝集素。生物化学与生物物理学报。**15**(4): 383 - 4。

王克夷、李士云、魏尧梅 1983 天花粉凝集素和天花粉胰蛋白酶抑制剂的亲和层析分离和一些性质。 生物化学与生物物理学报, **15**(2): 133 - 8。

名取俊二 1982 ヤンチニりバエの体液性しりチソと生体防御 食细胞の活性化に種をこえて普遍的に関与。化学と生物 **20**: 3—5。

Anderson, R. S., Day, N. K. B. and Good, R. A., 1972 Specific hemagglutinin and a modulator of complement in cockroach hemolymph. *Infect. Immunol.* **5**: 55.

Anderson, R. S., and Good, R. A., 1975 Naturally occurring hemagglutinin in a *Tunicate halocynthia* puriforms. *Biol. Bull.* **148**: 357.

Dabois, M., Gilles, K. A., Hamitou, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F., 1956 Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Anal. Chem.* **28**: 352.

Hall, J. L., and Rowland, D .T. Jr., 1974 Heterogenity of lobster agglutinins II. Specificity of agglutinin-erythrocyte binding. *Biochem.* **13**: 828.

Komano, H., Mizuno, D. and Natori, S., 1980 Purification of lectin induced in the hemolymph of *Sacrophage pereyrina* on injury. *J. Biol. Chem.* **255**: 2919—24.

Komano, H., Mizuno, D. and Natori, S., 1981 A possible mechanism of induction of insect lectin. *J. Biol. Chem.* **256**: 7087—9.

Lackie, A. M., 1983 Immunilogical recognition of cuticular transplants in insects. *Dev. and Comp. Immunol.* **7**: 41—50.

Maurer, H. R., 1971 Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. Walter de Gruyter. Berlin. New York press.

Mcknight, G. S., 1979 A colorimetric method for the determination of submicrogram quantities of protein. *Anal. Biochem.* **78**: 86—92.

Parrinello, N., and Canicatti, C., 1982 Carbohydrate binding specificity and purification by biospecific chromatography fo *Ascidia Malaca* hemagglutinins. *Dev. and Comp. Immuno.* **6**: 53—64.

Qu, et. al. 1982 Insect immunity: isolation and structure of cecropins B and D from pupae of the Chinese oak silk moth. *Antheraea pernyi, Eur. J. Biochem.* **127**: 219—24.

Renwrantz, L., 1983 Involvement of agglutins (lectin) in invertebrate defence reaction: the immuno-brological importance of carbohydrate specific binding moleculars. *Dev. and Comp. Immunol.* **7**: 603—8.

Ryoyama, K. 1974 Study on the biological properties of coelomic fluid of sea urchin II. Naturally occurring hemagglutinin in sea urchin. *Biol. Bull.* **146**: 404.

Segrest, J. P., and Jackson, R. L., 1972 Molecular weight determination and glycoprotein by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *Method in Enzymol.* **28**: 54—63.

Shiver, C. A., et. al, 1967 Specific antibodies produced against antigens of agar-gel precipitates. *Immunology.* **13**: 547.

Suzuki, T. and Natori, S., 1983 Identification of a protein having hemagglutinating activity in the hemolymph of the silkworm *Bombyz mori. J. Biochem.* (Tokyo) **93**: 583.

Wago, H., 1982 Cellular recognition of foreign material by *Bombyx mori* phagocytes I: Immunocompetent cells. *Dev. and Comp. Immunol.* **6**: 591—9.

Wago, H., 1983 Cellular recognition of foreign material by *Bombyx mori* phagocytes II: Role of hemolymph and phagocytes filopodia in the cellular reaction. *Dev. and Comp. Immunol.* **7**: 199—208.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LECTIN IN HEMOLYMPH FROM PUPAE OF THE CHINESE OAK SILKWORM *ANTHERAEA PERNYI*

LI SHI-YUN WU KE-ZUO ZHANG SHUANG-QUAN QIU XUE-ZHEN QU XIAN-MING

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

Hemolymph from pupae of the Chinese oak silk worm *Antheraea pernyi* was found to manifest hemagglutin activity. The specific activity of the hemagglutinin was raised in the hemolymph of the pupae by injection of viable *Escherichia coli.* A procedure is described for the isolation of the lectin from the normal pupae. The protein was homogeneous, as it was shown by SDS PAGE to give a single band and by immunodiffution to give rise to a preciptation line. The molecular weight of the lectin was found to be 40,000 daltons. The lectin agglutinated red blood cells from rabbit, duck, guinea pig, sheep, horse and A, B, O and AB human blood types. The activity was inhibited by D-galactose, D-lactose and N-acetyl-D-galactosamine. In hemolymph from pupae after challenge with *E. coli,* the composition of the proteins was more complicated. The lectin was isolated and gave two precipitation lines by immunodiffusion and at least two bands by PAGE.

Key words Antheraea pernyi——lectin——*Escherichia coli*